* * * * * * * * * *

云 南 植 物 研 究 1997; **19**(4): 445～448
Acta Botanica Yunnanica

乙酰丁香酮对发根农杆菌遗传转化黄瓜的影响

施和平 李 玲 潘瑞炽
(华南师范大学生物系，广州 510631)

EFFECT OF ACETOSYRINGONE ON TRANSFORMATION OF CUCUMIS SATIUSBY AGROBACTERIUM RHIZOGENES R1601

Shi Heping, Li Ling, Pan Ruichi
(*South China Normal University,* Guangzhou 510631)

关键词 乙酰丁香酮, 发根农杆菌, 毛状根, 黄瓜
Key words Acetosyringone, *Agrobacterium rhizogenes*, Hairy roots, *Cucumis sativus*

对根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) Ti (tumor inducing) 质粒转化机制的研究表明，受乙酰丁

1996-11-07 收稿, 1997-05-04 接受发表

香酮等植物信号因子激活的 vir (virulence)区基因的活化和高效表达是农杆菌 T-DNA 以 Ti 质粒向宿主细胞核中转移所必需的(Bolton *et al*, 1986; Stachel *et al*, 1986)，并能提高根癌农杆菌对宿主的转化率和敏感性(许耀等，1988)。但对乙酰丁香酮影响含 Ri(root inducing)质粒的发根农杆菌遗传转化的研究很少。本文研究乙酰丁香酮对发根农杆菌遗传黄瓜子叶的影响，为今后建立黄瓜高效遗传转化系统奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料培养 黄瓜(*Cucumis sativus* L.)津研四号种子用 0.1% $HgCl_2$ 消毒后，在光强 30 $\mu mol.m^{-2}.S^{-1}$，每天 12 h 光 25℃ 下萌发和培养。取萌发 10 d 的黄瓜子叶切成 0.5 cm^2 的小块, 在不含外源激素的 MS 培养基上预培养 24 h 后用于转化。

1.2 细菌菌株及培养 发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)R1601 具有质 pRiA4b，其中 HindⅢ片段 21 上整合 NPTⅡ(Neomysin phosphotransferase Ⅱ)基因，染色体背景与 C58 相同；同时该菌还具有超致病根癌农杆菌 pTiB0542 的 vir 区粘性质粒 pTVK291(Pythoud *et al*, 1987)。

农杆菌在含 100 mg／L 卡那霉素的 AB 培养基(Chilton *et al*, 1974)上划线培养，长出菌落后，挑取单菌落接于 YEB 液体培养基(Cervliet *et al*, 1975)中振荡培养，12 h 后加入乙酰丁香酮(acetosyringone，简称 AS)，用量为 20 μmol／L，培养 30 h 后供感染用；对照菌液不加乙酰丁香酮。

1.3 毛状根的诱导, 培养和鉴定 将上述预培养的子叶外植体浸于含发根杆菌 R1601 的 MS 培养液中 20 min，取出吸干多余菌液，放回至原培养基上共培养 2 d 后，转入 MS+500 mg／L 头孢噻肟钠(cefotaxime)的培养基上，25℃每日 12 h 散射光下诱导毛状根。

切下毛状根接种至 N(KNO_3, NH_4NO_3)的浓度为 MS 的 1／5，琼脂 1%，其余成份同 MS+500 mg／L 头孢噻肟钠的培养基上除菌培养。无菌的毛状根在无外源激素的 MS 培养基上保存和繁殖。

将毛状根捣碎离心，取上清液按 Ellis 等(1989)的方法检测冠瘿碱。电泳时间 90 min。

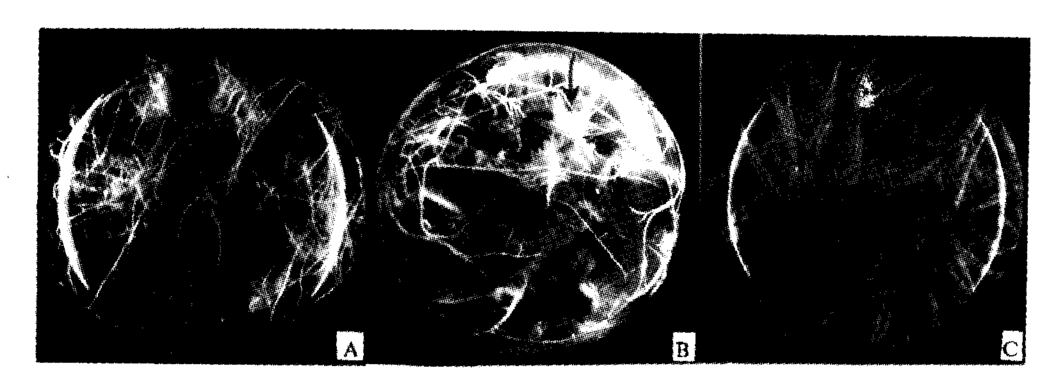


图 1 发根农杆菌 R1601 诱导黄瓜子叶外植体产生的毛状根

A. 不加乙酰丁香酮活化培养的 R1601 诱导的毛状根; B. 加乙酰丁香酮活化培养的农杆菌 R1601 诱导的毛状根(箭头所示为新毛状根); C. 乙酰丁香酮活化培养的 R1601 诱导的黄瓜毛状根在无激素的 MS 培养基上继代培养 30 d

Fig. 1 Hairy root from cucumber cotyledon explants infected with R1601

A. Hairy root with R1601 in the absence of acetosyringone; B. hairy roots with R1601 in the presence of acetosyringone(arrow indicated the new hairy root); C. The hairy root induced by R1601 in the presence of acetosyringone was subcu ltivated on solid hormone-free MS medium for 30 days

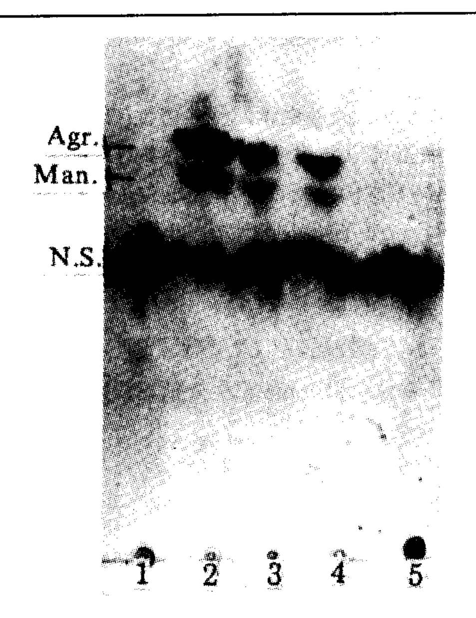


图 2　黄瓜毛状根中农杆碱和甘露的检测

1 道和 5 道: 正常根; 2 道: 农杆碱和甘露碱作标准品; 3 道: 发根农杆菌 R1601 诱导的毛状根; 4 道: 加乙酰丁香酮时发根农杆菌 R1601 诱导的一种毛状根. Ag 农杆碱; Man 甘露碱; N.S 中性糖

Fig 2　Detection of agropine and mannopine in hairy roots of *Cucumis sativus* L.

Lane 1 and Lane 5: normal roots. Lane 2: standard agropine and mannopine; Lane 3: hairy roots with R1601; Lane 4: The kind of hairy roots induced by R1601 in the presence of acetosyringone; Agr., agropine; Man., Mannopine; N.S., Neutral sugars

2　结果和讨论

2.1　乙酰丁香酮对黄瓜子叶产生毛状根的影响　从表 1 和图 1 可见，无论是否用乙酰丁香酮处理，非感染的子叶外植体培养 10 d 后不生根。而用加或不加乙酰丁香酮活化培养的菌液感染的子叶外植体，共培养 2～3 d 后其形态学下端中脉处产生白色或淡黄绿色愈伤组织，并陆续生根，10 d 后从愈伤组织长出许多毛状根，生根率分别为 88.89%和 94.20%。其添加乙酰丁香酮活化培养的菌液感染的子叶外植体生根更快，其形态学上端也产生白色或淡黄绿色愈伤组织，并部分生根，生根率约 30%；此外还可产生另一种形态的毛状根(图 1, B)，该根数量较少，短而粗，分枝多，无根毛，也能在无任何外源激素的 MS 培养基上自主生长，但在培养瓶中培养一月后毛状根就开始肿大(图 1, C)。

2.2　毛状根的鉴定　从图 2 可见，发根农杆菌 R1601 感染的黄瓜子叶外植体产生的两种毛状根都能合成甘露碱和农杆菌，这表明发根农杆菌 T-DNA 编码的冠瘿碱合成酶基因已在黄瓜基因组中表达。对照根(黄瓜子叶自然生根率低，故采用 0.1 mg／L NAA 诱导的不定根作对照)未检测到农杆碱和甘露碱，也不能在无外源激素的 MS 培养基上自主生长。

表 1　乙酰丁香酮对发根农杆菌 R1601 诱导黄瓜子叶外植体生根能力的影响

Table 1　Effect of acetosyringone(20 μmol／L)on rooting abilities of cucumber cotyledon explants with *Agrobacterium rhizogenes* R1601

菌　株 Bacterium strain	菌液处理 Treatment of bacterium	外植体数 No.of explants	生根的外植体% Percentages of explants rooting	
			5d	10d
Control	−AS	90	0	0
	+AS	68	0	0
R1601	−AS	99	35.13	88.89
	+AS	85	68.50	94.20

我们的结果表明，乙酰丁香酮能提高发根农杆菌 R1601 对黄瓜子叶外植体的致根能力。这与用乙酰丁香酮活化培养的发根农杆菌菌液感染丹参(*Salvia miltiorrhiza*)叶外植体的结果类似(Hu *et al*, 1993)。不

同的是，乙酰丁香酮活化培养的 R1601 菌液感染的黄瓜子叶外植体还可产生另一种形态的毛状根，其形态学上端可不同程序地生根，目前未见有这方面的报道。

一些研究证实，黄瓜子叶细胞常发生核内复制(endoreduplication)而产生体细胞多倍性(Gilissen *et al*, 1993)。业已证实番茄和马铃薯的核内多倍体(endoplyploid)细胞可以被发根农杆菌感染(Dhillon *et al*, 1982)。用发根农杆菌转化单倍体和双倍体马铃薯可得到两种不同形态的毛状根培养物(de Vries-Uijtewaal *et al*, 1988)。所以，乙酰丁香酮活化培养的发根农杆菌感染后，黄瓜子叶外植体能产生两种形态的毛状根，可能与乙酰丁香酮对农杆菌 Vir 区的活化引起 RiT-DNA 在植物基因组织中产生多位点的插入和整合以及与黄瓜子叶细胞本身独特的遗传特性和结构有关。

致谢 中科院植物所林忠平先生和法国国家科学研究中心 Jacquès Tempe 先生分别馈赠发根农杆菌菌种和冠瘿碱样品。

参 考 文 献

许耀，贾敬芬，郑国昌，1988. 酚类化合物促进根癌农杆菌对植物离体外植体的高效转化. 科学通报，33(22): 1745～1748

Bolton G W, Nester E W, Gordon M P, 1986. Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. *Science*, **232**: 983～985

de Vries-Uijtewaal E, Gilissen L J W, Flipse E *et al*, 1988. Characterzation of root clones obtained after transformation of manohaploid and diploid potato genotypes with hairy root inducing strains of Agrobacterium. *Plant Sci*, **58**: 193～202

Dhillon S S, Miksche J P, 1982. DNA content and heterochromatin variation in various tissues of peanut(*Arachis hypogaea*). *Amer J Bot*, **69**: 219～226

Ellis D, Roberts D, Sutton B *et al*, 1989. Transformation of white spruce and other conifer species by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, **8**: 16～20

Gilissen L J W, Staveren M J, Creemers-Molenaar C *et al*, 1993. Development of polysomaty in seedlings and plants of *Cucumis sativs L.* in vitro. *Plant Sci*, **91**:171～79

Hu Z B, Alfermann A W, 1993. Dierpenoid production in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry*, **32**(3): 699～703

Stachel S E, Nerster E W, Zambryski P C, 1986. A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression. *Proc Natl Acad Sci*, USA, **83**: 379～383